

BF

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
10. Mai 2002 (10.05.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/37117 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: G01N 33/68

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/12295

(22) Internationales Anmeldedatum:
24. Oktober 2001 (24.10.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
100 54 055.4 31. Oktober 2000 (31.10.2000) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): NMI NATURWISSENSCHAFTLICHES UND MEDIZINISCHES INSTITUT AN DER UNIVERSITÄT TÜBINGEN [DE/DE]; Markwiesenstrasse 55, 72770 Reutlingen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): JOOS, Thomas [DE/DE]; Eichhaldenstrasse 18, 72074 Tübingen (DE). STOLL, Dieter [DE/DE]; Wörthstrasse 128, 72766 Reutlingen (DE).

(74) Anwälte: OTTEN, Hajo usw.; Witte, Weller & Partner, Postfach 10 54 62, 70047 Stuttgart (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR ANALYZING PROTEINS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR ANALYSE VON PROTEINEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for analyzing proteins, according to which an array of first scavenger molecules that are specific to peptide epitopes is used. The proteins to be analyzed or a protein mixture containing the proteins to be analyzed is broken down into peptide fragments that correspond to the peptide epitopes, whereupon the array of scavenger molecules is incubated with the peptide fragments. Afterwards, peptide fragments bound to the scavenger molecules are identified.

(57) Zusammenfassung: Bei einem Verfahren zur Analyse von Proteinen wird ein Array von für Peptidepitope spezifischen ersten Fängermolekülen eingesetzt. Die zu analysierenden Proteine oder eine die zu analysierenden Proteine enthaltende Proteinmischung wird zu den Peptidepitopen entsprechenden Peptidfragmenten abgebaut, woraufhin das Array von Fängermolekülen mit den Peptidfragmenten inkubiert wird. Anschliessend werden an die Fängermoleküle gebundene Peptidfragmente nachgewiesen.

WO 02/37117 A1



Verfahren zur Analyse von Proteinen

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Analyse von Proteinen, bei dem ein Array von für Peptidpitope spezifischen ersten Fängermolekülen eingesetzt wird.

Derartige Verfahren sind umfangreich aus dem Stand der Technik bekannt, sie dienen der qualitativen bzw. quantitativen Analyse von Proteinen.

Einsatzgebiete der bekannten Verfahren sind beispielsweise die Proteinanalytik und der Proteinnachweis. Ein weiteres, neues Anwendungsgebiet der bekannten Verfahren ist das Gebiet der Proteomik, ein Forschungszweig, der sich ganz den Proteinen widmet. Ein Aspekt der Proteomik behandelt den Vergleich der Proteinzusammensetzung in krankhaft veränderten Zellen im Gegensatz zu normalen, gesunden Zellen. Derartige Untersuchungen werden heutzutage in der Regel mittels zweidimensionaler Gel-Elektrophorese durchgeführt. Ein anderer Bereich untersucht die räumliche Struktur der Proteine, die insbesondere für Pharmaunternehmen zur Entwicklung neuer Medikamente interessant ist.

Bei der zweidimensionalen Gel-Elektrophorese wird das zu untersuchende Proteingemisch auf einen festen Träger aufgebracht, wobei eine erste Trennung nach dem Gehalt der Proteine an sauren und basischen Aminosäurebausteinen über einen pH-Gradienten erfolgt. Ein elektrisches Feld trennt anschließend die Proteine in der zweiten Richtung auf, so daß ein Fleckenmuster entsteht, in dem jeder Fleck für ein Protein steht. Durch Vergleich der Fleckenmuster können Unterschiede in der Proteinzusammensetzung zwischen gesunden und krankhaft veränderten Zellen untersucht werden. Zur Identifizierung werden die Proteinflecken ausgestanzt und die Proteine durch Verdau mit spezifischen Proteasen in Fragmente zerlegt. Die Massen der Fragmente, die nach dieser Behandlung übrig bleiben, sind für jedes Protein charakteristisch.

Bei dem eingangs erwähnten Verfahren zur Analyse von Proteinen erfolgt der Nachweis beispielsweise im Arrayformat mit proteinspezifischen Antikörpern.

Zur Gewinnung derartiger proteinspezifischer Antikörper werden bei der Anmelderin isolierte, gereinigte Proteine, rekombinant produzierte Proteine oder aus der Proteinsequenz abgeleitete, chemisch synthetisierte Peptide eingesetzt. Die Gewinnung der Antikörper erfolgt durch Immunisierung von Versuchstieren mit den als Antigenen wirkenden Proteinen bzw. Peptiden sowie mit Adjuvantien. Andererseits ist es auch möglich, die Antikörper über *in-vitro*-Verfahren als rekombinante Antikörper zu gewinnen.

Die Ableitung der chemisch zu synthetisierenden Peptide aus bekannten Proteinsequenzen, die z.B. in Proteindatenbanken enthalten sind oder aus Nukleinsäuredatenbanken ermittelt werden können, erfolgt über Software-Programme, mit denen theoretische Vorhersagen über die Proteinstruktur und eine mögliche Antigenizität getroffen werden können. Derartige Programme werden beispielsweise von Lars Hennig: "WinPep - ein Programm zur Analyse von Aminosäuresequenzen", BIOSPEKTRUM 4 (5), 1998, Seiten 49-50 oder von Devereux et al.: "A Comprehensive Set of Sequence Analysis Programs for the VAX", NUCLEIC ACIDS RESEARCH, Band 12, 1984, Seiten 387-395 beschrieben. Mit diesen Programmen lassen sich alle möglichen Fragmente mit Molekulargewicht, Sequenz, Sequenzposition und Länge aufführen, die bei einer Spaltung von Proteinen beispielsweise durch Proteasen oder chemische Agenzien erzeugt werden. Zur Vorhersage der Antigenizität wird aufgrund struktureller Vorhersagen die Wahrscheinlichkeit ermittelt, mit der das Epitop an der Proteinoberfläche liegt; siehe z.B. Hopp and Woods: "A computer program für predicting protein antigenic determinants", Mol.Immunol., Band 20, 1983, Seiten 483-489; weitere Literaturhinweise finden sich im World Wide Web unter der Adresse www.expasy.ch.

Die durch Anwendung dieser Techniken erzeugten Antikörper erkennen zwar sehr gut das zur Immunisierung eingesetzte Peptid, binden aber häufig nicht an das entsprechende Peptidepitop im nativen Protein. Dies kann beispielsweise daran liegen, daß das Peptidepitop im nativen Protein aus sterischen Gründen für den Antikörper nicht zugänglich ist oder daß es in einer infolge von posttranslationaler Modifikation modifizierten Form vorliegt, die sich aus der Datenbank nicht ableiten läßt. Ein weiterer Grund kann darin liegen, daß das Peptidepitop im nativen Protein in einer Konformation vorliegt, die eine Antikörper-Bindung verhindert.

Bei dieser Technik ist es also von Nachteil, daß zunächst aufwendig eine Vielzahl peptidspezifischer Antikörper gegen Proteinepitope erzeugt werden, die anschließend nicht oder nur schlecht an das gesuchte Protein binden.

Der Proteinnachweis mit derartigen proteinspezifischen Antikörpern kann zum einen nach Auftrennung mittels SDS-PAGE und Transfer auf Membranen über Westernblot/Immunoblot-Techniken oder mittels der ELISA-Technik erfolgen. Bei der ELISA-Technik wird das nachzuweisende Protein ohne vorherige Abtrennung anderer Proteine aus einer kompletten Proteinlösung direkt an einen hochspezifischen, an einem festen Träger immobilisierten Antikörper gebunden. Die Proteinlösung wird danach vom festen Träger abgewaschen und das gebundene, also an dem Träger verbleibende Protein nachgewiesen.

Dieser Nachweis erfolgt entweder mit Hilfe von markierten, für das gebundene Protein spezifischen Zweitantikörpern oder durch Konkurrenz des Analytproteins mit der Lösung in definierter

Menge zugesetztem, markiertem Analytprotein. Bei diesem indirekten Nachweis wird ausgenutzt, daß unmarkiertes Analytprotein aus der Probe und zugesetztes markiertes Analytprotein in einer durch das Massenwirkungsgesetz definierten Weise um die vorhandenen Bindungsstellen konkurrieren. Daraus ergibt sich, daß die Menge des gebundenen, markierten Analytproteins umgekehrt proportional zur Menge des nicht-markierten Analytproteins in der Probe ist.

Dieses Verfahren weist zum einen den bereits erwähnten Nachteil auf, daß nämlich die Herstellung der spezifischen Antikörper zu einer Vielzahl von Antikörpern führt, die nicht oder nur schlecht an das zu untersuchende Protein binden. Beim Einsatz der Westernblot-Technik ist weiter von Nachteil, daß die durch SDS-PAGE aufgetrennte Proteinmischung jeweils nur mit einem Antikörper bzw. mit unterschiedlich markierten Antikörpern getestet werden kann, um eine Unterscheidbarkeit der an die verschiedenen Proteine gebundenen Antikörper zu gewährleisten.

Auch bei der ELISA-Technik kann immer nur ein Antikörper pro Analysenkavität immobilisiert und anschließend mit der Proteinlösung inkubiert werden. Diese Technik erfordert große Probenmengen, da jede Analysenkavität mit einem Aliquot der Proteinmischung inkubiert werden muß. Bei dem bekannten Verfahren ist weiter von Nachteil, daß der Nachweis der gebundenen Proteine spezifische Zweitantikörper für jedes nachzuweisende Protein oder große Mengen an markierten Analytproteinen für Konkurrenzexperimente erfordert.

Wie bereits eingangs erwähnt, werden bei der Anmelderin proteinspezifische Antikörper mit unterschiedlicher Spezifität

auch im Arrayformat in Reihen und Spalten auf einem Trägermaterial funktionell immobilisiert. Die zu untersuchenden Proteine werden markiert und danach mit den Antikörpern auf dem Array inkubiert. Die Proteine in der Lösung, die Antigene für die immobilisierten Antikörper darstellen, binden dabei an die für sie spezifischen Antikörper, so daß sich eine orts aufgelöste spezifische Proteinbindung ergibt.

Aufgrund der bekannten Bindungsspezifitäten der immobilisierten Antikörper und der bekannten Positionen der jeweiligen Antikörper im Array kann die gebundene Menge der jeweiligen Proteine parallel bestimmt werden. Hierzu wird mittels einer orts aufgelösten Detektion die gebundene Proteinmenge über die Markierung an den Proteinen gemessen.

Neben dem qualitativen, parallelen Nachweis verschiedener in der Probenlösung vorhandener Proteine kann durch Einsatz von Standardproteinen zusätzlich eine quantitative Bestimmung der Analytproteine erfolgen.

Im Gegensatz zu dem oben beschriebenen Verfahren ist hier von Vorteil, daß in derselben Probe und in einer Kavität mehrere Proteine parallel detektiert werden können. Von Nachteil ist jedoch, daß die zu analysierenden Proteine markiert werden müssen, wozu entsprechende Markierungen an bestimmten funktionellen Gruppen einzelner Aminosäuren der Proteine eingeführt werden. Die Effizienz derartiger Markierungsreaktionen ist bei verschiedenen Proteinen sehr unterschiedlich, sie wird durch die jeweilige direkte Mikroumgebung einer funktionellen Gruppe bestimmt, also durch sterische Abschirmung, pH-Variation in direkter Umgebung der funktionellen Gruppe durch Nachbargruppen,

Salze, Solventien usw. Vom Ergebnis her bedeutet dies, daß die Reaktivität chemisch identischer funktioneller Gruppen in einem Protein sehr unterschiedlich sein kann, so daß eine quantitative Umsetzung bestimmter funktioneller Gruppen sehr schwierig ist.

Darüber hinaus kann die Markierungsreaktion dazu führen, daß Aminosäuren innerhalb eines vom spezifischen Antikörper erkannten Epitops modifiziert werden, was zum Verlust der Bindung zwischen Proteinepitop und Antikörper führt. Damit ist aber das Protein nach der Markierung durch das beschriebene Testverfahren nicht mehr nachweisbar.

Vor diesem Hintergrund liegt der vorliegenden Erfindung die Aufgabe zugrunde, das eingangs genannte Verfahren derart weiterzubilden, daß eine quantitative und/oder qualitative Analyse von Proteinen auf einfache, schnelle und zuverlässige Weise möglich wird.

Bei dem eingangs genannten Verfahren wird diese Aufgabe erfindungsgemäß gelöst durch die Schritte:

Abbau der zu analysierenden Proteine oder einer die zu analysierenden Proteine enthaltenden Proteinmischung zu den Peptid-epitopen entsprechenden Peptidfragmenten,

Inkubation des Arrays mit den Peptidfragmenten, und

Nachweis von an die ersten Fängermoleküle gebundenen Peptidfragmenten.

Die der Erfindung zugrunde liegende Aufgabe wird auf diese Weise vollkommen gelöst. Der Erfindung liegt die überraschende Erkenntnis der Erfinder zugrunde, daß die im Arrayformat immobilisierten Fängermoleküle nicht wie im Stand der Technik mit den Proteinen sondern nach beispielsweise enzymatischer Spaltung der Proteine mit einzelnen Peptidfragmenten inkubiert werden, die den Peptidepitopen entsprechen, die für die Generierung der spezifischen ersten Fängermoleküle eingesetzt werden.

Bei diesem Verfahren ist zum einen von Vorteil, daß die Sekundär- und Tertiärstruktur der zu analysierenden Proteine keine Rolle spielt, die ersten Fängermoleküle erkennen die entsprechenden Peptidfragmente mit großer Sicherheit, da sie gegen entsprechende Peptidepitope generiert wurden. Diese Epitope können unmittelbar aus Datenbanken vorhergesagt werden, eine zusätzliche aufwendige Vorhersage von Sekundär- und Tertiärstruktur ist nicht erforderlich. Auf diese Weise ist das neue Verfahren nicht nur sehr zuverlässig, es ist auch einfach und schnell durchzuführen, da die ersten Fängermoleküle zuverlässig die Proteine über die nachgewiesenen Peptidfragmente erkennen.

Ein weiterer Vorteil ist darin zu sehen, daß jedes Fängermolekül sein optimales Antigen erkennt, denn das synthetische Peptid, das zur Erzeugung von Fängermolekülen verwendet wird, ist identisch zu dem nachzuweisenden Peptidfragment. Auf diese Weise wird der im Stand der Technik vorhandene Nachteil vermieden, daß bei Proteinen nämlich nicht vorhersagbar ist, ob ein peptidspezifischer Antikörper auch das native Protein erkennt. Mit anderen Worten bedeutet dies, daß der Ausschuß bei den ersten Fängermolekülen deutlich gegenüber dem Stand der Technik verringert ist.

Da die Anordnung der unterschiedlichen ersten Fängermoleküle in dem Array bekannt ist, kann mittels einer automatisierbaren, orts aufgelösten Detektion eine qualitative Identifizierung und quantitative Bestimmung der Fragmente und damit der Proteine erfolgen. Die gefundenen Peptidmuster korrelieren nämlich direkt mit dem Proteinmuster, das bei dem Entwurf des Arrays als Analytprotein festgelegt wurde. Außerdem können gefundene Peptidmuster mit einfachen, schnellen Algorithmen gegen DNA-Datenbanken gescreent werden.

Auf diese Weise ist eine schnelle und zuverlässige Aussage darüber möglich, welche Proteine in einer Probenlösung vorhanden sind, was beispielsweise bei der Diagnostik eingesetzt werden kann. Ferner ist mit dem neuen Verfahren erstmals eine einfache Mutationsanalytik auf Proteinebene möglich.

Ein weiterer Vorteil bei dem bekannten Verfahren liegt in seiner Geschwindigkeit, denn die niedermolekularen Fragmente erlauben die schnellere Durchführung von Bindungsassays als hochmolekulare Proteine. Es ergibt sich somit eine kinetische Beschleunigung der Assays, wobei eine ähnliche Kinetik der Analytbindung zur einfacheren Etablierung optimaler Bedingungen für die Assays führt, als dies bei der stark variierenden Kinetik der Fall ist, die sich für in ihrem Molekulargewicht stark variable Analytproteine ergibt.

Ein weiterer Vorteil des neuen Verfahrens besteht darin, daß der Abbau der zu analysierenden Proteine zu den Peptidfragmenten definiert und vollständig erfolgen kann, und daß sich die Fragmente im Gegensatz zu Proteinen an definierten funktionellen Gruppen quantitativ markieren lassen. Dies führt

dazu, daß der Nachweis der Peptidfragmente nicht nur qualitativ sondern auch quantitativ möglich wird, ohne daß auf Sekundär- und Tertiärstrukturen geachtet werden muß.

In einer Weiterbildung ist es dann bevorzugt, wenn nach der Inkubation ungebundene Peptidfragmente gewaschen werden.

Hier ist von Vorteil, daß in an sich bekannter Weise die Spezifität des Verfahrens erhöht wird.

Weiter ist es bevorzugt, wenn die Peptidfragmente nach der Inkubation markiert werden.

Da eine spezifische, vollständige Markierung der Peptidfragmente an definierten funktionellen Gruppen möglich ist, läßt sich auf diese Weise eine quantitative Bestimmung jedes gebundenen Peptidepitopes durchführen. Dabei ist von Vorteil, daß eine vollständige Markierung der Peptidfragmente leichter und reproduzierbarer möglich ist als eine Markierung von Proteinen, wie dies im Stand der Technik durchgeführt wird.

Weiter ist es bevorzugt, wenn der Nachweis über markierte zweite Fängermoleküle erfolgt, die spezifisch das an das erste Fängermolekül gebundene Peptidfragment erkennen.

Hier ist zum einen von Vorteil, daß die Peptidfragmente nicht markiert werden müssen, so daß das Verfahren insgesamt schneller durchgeführt werden kann, denn markierte zweite Fängermoleküle können in einem einzigen Verfahrensschritt in großer Menge zur Verfügung gestellt werden, woraufhin dann viele erfindungsgemäße Analyseverfahren mit unterschiedlichen Proben von Pro-

teinen durchgeführt werden können, die jeweils nur zu den entsprechenden Peptidfragmenten abgebaut werden müssen.

Ein weiterer Vorteil dieser Maßnahme besteht darin, daß die Selektivität erhöht wird, denn unspezifisch vom ersten Fängermolekül gebundene Peptidfragmente werden nicht erkannt, da die zweiten Fängermoleküle an diese Komplexe nicht binden.

Dabei ist es bevorzugt, wenn die zweiten Fängermoleküle ausgehend von Komplexen aus ersten Fängermolekülen und daran gebundenen Peptidepitopen erzeugt werden.

Hier ist von Vorteil, daß sehr spezifische zweite Fängermoleküle erzeugt werden, die zudem mit hoher Erfolgsquote herstellbar sind.

Insgesamt ist es bevorzugt, wenn die ersten Fängermoleküle ausgehend von Peptidepitopen erzeugt werden, die gezielt im Hinblick auf Peptidfragmente hergestellt werden, die bei dem Abbau der zu analysierenden Proteine entstehen.

Diese Maßnahme ist mit einer ganzen Reihe von Vorteilen verbunden. Zum einen lassen sich die ersten Fängermoleküle gegen die linearen Peptidepitope mit hoher Erfolgsquote produzieren, da die Peptidepitope zur Herstellung bzw. Isolierung der Fängermoleküle mit den zu analysierenden Peptidepitopen vollständig identisch sind. Dies führt dazu, daß bei der Herstellung der ersten Fängermoleküle erheblich weniger Ausschuß produziert wird, als bei der Herstellung von proteinspezifischen Fängermolekülen. Solche Peptidepitope zur Herstellung bzw. Isolierung der Fängermoleküle können schnell und preiswert hergestellt und

vollständig analytisch charakterisiert werden, was einen weiteren Vorteil gegenüber dem Stand der Technik darstellt.

Darüber hinaus wird durch diese Maßnahme auch die Spezifität des neuen Verfahrens erhöht. In verschiedenen Proteinen vorkommende Epitope können nämlich durch weitere proteinspezifische Epitope so ergänzt werden, daß die Kombination der auf dem Array nachgewiesenen Epitope für bestimmte Analytproteine eindeutig ist. Auf diese Weise werden nicht nur Spezifität und Redundanz des neuen Verfahrens erhöht, es ist auch eine gezielte Optimierung für den Nachweis bestimmter Proteine möglich.

Die Peptidepitope können dabei durch chemische Synthese oder enzymatischen Abbau aus bekannten Proteinen hergestellt werden, so daß sie mit Standardmethoden kostengünstig und schnell vollständig analytisch charakterisierbar sind.

Dabei ist es weiter bevorzugt, wenn die gezielt hergestellten Peptidepitope ausgewählt werden aus potentiellen Peptidepitopen der zu analysierenden Proteine.

Hier ist zum einen von Vorteil, daß nur Peptidepitope hergestellt werden, gegen die sich auch Fängermoleküle erzeugen lassen. Diese Maßnahme führt also zu einer Zeit- und Syntheseersparnis bei der Herstellung der ersten und/oder zweiten Fängermoleküle. Unter "potentiellen" Peptidepitopen werden dabei alle möglichen Epitope eines Proteins verstanden, also auch solche, die nicht auf der Oberfläche des Proteins vorliegen und bisher nicht für die Generierung von Fängermolekülen verwendet wurden. Dabei ist weiter von Vorteil, daß pro Protein viel mehr mögliche Epitope in Betracht gezogen werden können als im Stand der

Technik, so daß z.B. bei sehr ähnlichen oder nahe verwandten Proteinen eine viel größere Auswahl an Peptidepitopen zur möglichen Unterscheidung zwischen den Proteinen zur Verfügung steht.

Darüber hinaus ist von Vorteil, daß nur solche Peptidepitope hergestellt werden, die auch für ein Protein bzw. für wenige Proteine spezifisch sind.

Dabei ist es bevorzugt, wenn die potentiellen Peptidepitope aus bekannten Aminosäure- und/oder Nukleinsäuresequenzen der zu analysierenden Proteine abgeleitet werden.

Hier ist zum einen von Vorteil, daß die Vorhersage der Peptidepitope von nachzuweisenden Proteinen aus DNA- oder Proteindatenbanken ohne Berücksichtigung der Proteintertiärstruktur erfolgt. Eine einfache Vorhersage der Proteinspaltstellen für die zur spezifischen Proteinspaltung eingesetzten Agenzien reicht aus, wobei eine Auswahl von einem oder mehreren Peptidepitopen mit möglichst hoher Spezifität für das Analytprotein erfolgt. Im Optimalfall tritt das Epitop nur im Analytprotein auf.

Weiter ist es bevorzugt, wenn als potentielle Peptidepitope solche Sequenzabschnitte ausgewählt werden, die bei dem Abbau der zu analysierenden Proteine erhalten bleiben.

Bei dieser Maßnahme ist die Zeitersparnis von Vorteil, es werden nämlich nur solche Fängermoleküle erzeugt, für die auch Peptidfragmente entstehen können, wobei bei den potentiellen Peptidepitopen darauf geachtet wird, daß sie für eines oder für

wenige Analytproteine spezifisch sind und daß ihre Herstellung mit hoher Wahrscheinlichkeit möglich ist.

Die Vorhersage der bei der chemischen Synthese schwierig zugänglichen Peptidsequenzen kann als weiteres Kriterium zur Auswahl der Peptidepitope herangezogen werden. Die klassische Vorhersage immunogener linearer Peptidsequenzen, bei der aufgrund der Hydropathieprofile (Kyte and Doolittle, "A Simple Method for Displaying the Hydropathic Character of a Protein", J. MOL. BIOL 157 (1982), Seiten 105-132) und der Vorhersage von β -Loop-induzierenden Sequenzabschnitten (Chou and Fasman, "Prediction of Protein Conformation", BIOCHEMISTRY 13, 1974, Seiten 222-245) potentielle lineare Peptidepitope in Proteinstrukturen identifiziert werden, ist hier nicht erforderlich, da nach Denaturierung und Abbau der Analytproteine alle Peptidfragmente unabhängig von ihrer Position in der Proteinstruktur potentielle Peptidepitope darstellen.

Dies führt zu einer größeren Auswahl an potentiellen Peptidepitopen und damit zu einer größeren Wahrscheinlichkeit, für zu analysierende Proteine (im folgenden: Analytproteine) spezifische Epitope zu finden, als bei Arrays aus Fängermolekülen, die mit vollständigen Analytproteinen inkubiert werden.

Weiter ist es bevorzugt, wenn die gezielt hergestellten Peptidepitope so markiert und/oder modifiziert werden, wie die Peptidfragmente nach/bei dem Abbau der zu analysierenden Proteine.

Bei dieser Maßnahme ist zum einen von Vorteil, daß sie zu einer hohen Spezifität der ersten Fängermoleküle gegen die Peptidfragmente führt, da bereits bei der Herstellung der zur Erzeu-

gung der ersten Fängermoleküle verwendeten Peptidepitope berücksichtigt wird, ob die Peptidfragmente nach/bei dem Abbau der zu analysierenden Proteine markiert bzw. modifiziert werden.

Ein weiterer Vorteil ist in dem gezielten Einbau von Markierungen bei automatischer chemischer Synthese zu sehen, wodurch eine schnelle und preiswerte, vollständig definierte Markierung möglich wird, was einfacher, preiswerter und reproduzierbarer ist als eine Markierung von Gesamtprotein.

Dabei ist es bevorzugt, wenn die gezielt hergestellten Peptidepitope mit posttranslationalen Modifikationen versehen werden.

Bei dieser Maßnahme ist von Vorteil, daß die zu analysierenden Proteine gezielt auf posttranslationale Modifizierungen hin gescreent werden können. Dabei können beispielsweise Peptidepitope aus dem Bereich potentieller Phosphorylierungsstellen eines Proteins als synthetische Phosphorpeptide und als unphosphorylierte Peptide hergestellt werden, um Fängermoleküle gegen die jeweiligen Peptidepitope zu generieren. Ein Array aus derartigen Fängermolekülen, die die unterschiedlichen phosphorylierten bzw. unphosphorylierten Peptidepitope erkennen, kann dann eingesetzt werden, um Phosphorylierungszustände eines oder mehrerer Proteine direkt aus einer Proteinmischung heraus zu quantifizieren. Andere Modifikationen, die auf diese Weise gescreent werden können, umfassen modifizierte Aminosäuren, Glykopeptide etc.

Weiter ist es bevorzugt, wenn die gezielt hergestellten Peptidepitope gegenüber den potentiellen Peptidepitopen zumindest

einen Aminosäureaustausch und/oder zumindest eine Deletion einer Aminosäure aufweisen.

Bei dieser Maßnahme ist von Vorteil, daß ein Single Nucleotide Polymorphismus erkannt werden kann, denn der Austausch bzw. die Deletion einzelner Aminosäuren in Proteinen kann auf diese Weise detektiert und quantifiziert werden. Dazu werden Epitope aus dem Bereich des Aminosäureaustausches als synthetische Peptide hergestellt, um spezifische Fängermoleküle gegen diese Epitope zu generieren. Nach enzymatischem Abbau der entsprechenden Proteine und ggf. Markierung der generierten Peptidfragmente sowie Inkubation mit dem Array können die durch den Single Nucleotide Polymorphismus möglichen verschiedenen Peptide mit den unterschiedlichen Aminosäureaustauschen und -deletionen direkt auf dem Array nachgewiesen und quantifiziert werden.

Insgesamt ist es bevorzugt, wenn das oder jedes Fängermolekül ein Antikörper, ein Antikörperfragment, ein Peptid-Aptamer oder sonstiges durch chemische Synthese oder Mutation von Bindungsdomänen rekombinant herstellbares Fängermolekül ist.

Weiter ist es bevorzugt, wenn die Bindungsspezifität der Fängermoleküle durch Bindungstests mit in einzelnen Aminosäuren oder in ihrer Länge variierten Peptiden ermittelt wird. Dadurch ist eine vollständige Charakterisierung der Spezifität der generierten Fängermoleküle zur Vermeidung von Kreuzreaktivität gegen andere Epitope schnell und kostengünstig möglich. Bei Proteinen selbst ist dies mit vertretbarem Aufwand nicht durchführbar.

Dies kann erfindungsgemäß nun entweder im Array mit synthetischen Peptiden jeweils einer definierten Sequenz oder mit Peptidbibliotheken gegen einzelne, immobilisierte Fängermoleküle und anschließender Identifizierung gebundener Peptide erfolgen.

Vor diesem Hintergrund betrifft die vorliegende Erfindung ferner ein Fängermolekül, insbesondere zur Verwendung in einem Verfahren der vorstehenden Art, das spezifisch an Peptidepitope bindet, die Peptidfragmenten entsprechen, in die zu analysierende Proteine abbaubar sind, wobei die Peptidepitope vorzugsweise in dem Protein selbst für das Fängermolekül nicht zugänglich sind.

Bei diesen im Stand der Technik bisher nicht aufzufindenden Fängermolekülen ist von Vorteil, daß sie sehr spezifisch auch sehr ähnliche oder nah verwandte Proteine unterscheiden können, da die Zahl der nicht auf der Oberfläche vorliegenden Peptidepitope, die also beispielsweise im Protein selbst maskiert sind, sehr groß ist. Auf diese Weise stehen sehr viele Peptidepitope zur Verfügung, die im Stand der Technik bisher nicht berücksichtigt wurden, um spezifische Antikörper zu generieren, die zur Diagnostik, Mutationsanalytik etc. auf Proteinebene eingesetzt werden können.

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung ein Fängermolekül, das spezifisch an einen Komplex aus einem vorgeannten Fängermolekül und dem entsprechenden Peptidepitop bindet.

Derartige, zweite Fängermoleküle können verwendet werden, um die Spezifität des Nachweistestes zu erhöhen, wie dies im Zu-

sammenhang mit den einzelnen Verfahrensschritten bereits ausführlich beschrieben wurde.

Es versteht sich, daß die vorstehend genannten und die nachstehend noch zu erläuternden Merkmale und Vorteile nicht nur in der angegebenen Kombination, sondern auch in Alleinstellung oder in anderer Kombination verwendbar sind, ohne den Rahmen der vorliegenden Erfindung zu verlassen.

Das Grundprinzip des Verfahrens zur quantitativen und/oder qualitativen Analyse von Proteinen besteht darin, ein Array von für Peptidpitope spezifischen ersten Fängermolekülen einzusetzen, wobei nicht Proteine sondern nach beispielsweise enzymatischer Spaltung der Proteine einzelne Peptidfragmente, die den Peptidpitopen entsprechen, mit den im Arrayformat immobilisierten proteinspezifischen Fängermolekülen nachgewiesen werden.

Dazu werden zunächst potentielle Peptidpitope oder Proteinsequenzen in Protein- oder Gensequenzdatenbanken theoretisch vorhergesagt. Da bei der enzymatischen oder chemischen Spaltung der nachzuweisenden Proteine einzelne Epitope geteilt werden können, muß zur Vorhersage potentieller Peptidpitope die Schnittspezifität der zum Proteinabbau verwendeten Proteasen berücksichtigt werden. Potentielle Peptidpitope, die nach diesen Kriterien für die einzelnen Proteine theoretisch vorhergesagt wurden, werden mittels chemischer Peptidsynthese hergestellt und an spezifischen funktionellen Gruppen, beispielsweise der Aminofunktion des N-Terminus oder der ϵ -Aminogruppe von Lysin, beispielsweise mit Fluorophor, Biotin etc. markiert.

Diese Peptidepitope werden dann zur an sich bekannten Herstellung von Antikörpern durch Immunisierung verwendet. Die so hergestellten Fängermoleküle, die im einfachen Fall Antikörper sein können, werden dann in Reihen und Spalten auf dem Array immobilisiert.

Durch enzymatische oder chemische Abbaureaktion aller Proteine der gesamten zu analysierenden Proteinmischung mit spezifischen Proteasen, wie beispielsweise Trypsin, Endoprotease Lys C etc., werden den Peptidepitopen entsprechende Proteinfragmente gewonnen, die dann mit dem Array inkubiert und anhand ihrer Bindung an die ersten Fängermoleküle nachgewiesen werden.

Zum Nachweis können zum einen die erhaltenen Peptidfragmente mit einem Marker, wie beispielsweise Fluorophor, Biotin etc., an denselben spezifischen funktionellen Gruppen markiert werden, wie die zur Erzeugung der spezifischen Fängermoleküle eingesetzten synthetischen Peptidepitope. Die entsprechend markierten Peptide werden auf den Antikörperarrays inkubiert, die nicht gebundenen Peptidfragmente gewaschen und die gebundenen Peptidfragmente über ihre Markierung ortsspezifisch nachgewiesen. Da eine vollständige Markierung der Peptide möglich ist, kann eine quantitative Bestimmung eines jeden gebundenen Peptidepitopes erfolgen.

Andererseits können auch nicht-markierte Peptidepitope nachgewiesen werden, wenn ein markiertes zweites Fängermolekül eingesetzt wird, das im einfachsten Falle ein Zweitantikörper sein kann, der das am immobilisierten Antikörper gebundene Peptid erkennt. Dieser Zweitantikörper wird gegen das am immobilisierten Antikörper gebundene Peptid generiert, wodurch es zu einer

drastischen Erhöhung der Selektivität kommt, da nur das spezifische Peptidfragment am immobilisierten ersten Antikörper erkannt wird und dort unspezifisch gebundene Peptidfragmente vom zweiten Antikörper nicht gebunden werden.

Auf diese Weise werden nur Peptide, die potentielle Immunogene darstellen und beim Proteinabbau nicht fragmentiert werden, für die Immunisierung eingesetzt, was zu einer Ersparung bei der chemischen Peptidsynthese und der Herstellung spezifischer Fängermoleküle führt, da hochaffine, peptidfragmentspezifische Fängermoleküle mit hoher Erfolgsquote produziert werden können. Dies führt zu weniger Fängermolekülausschuß als bei der Herstellung proteinspezifischer Fängermoleküle.

Die Bindungsspezifität der gewonnenen Fängermoleküle, hier also Antikörper im Arrayformat, kann durch Bindungstest mit in einzelnen Aminosäuren variierten definierten synthetischen Peptiden erfolgen. Alternativ können auch synthetische Peptidbibliotheken, die alle theoretisch möglichen Peptidsequenzen enthalten, mit einzelnen, z.B. auf Affinitätschromatographiesäulen immobilisierten Antikörpern inkubiert werden. Die aus den Peptidgemischen gebundenen Peptide können nach Denaturierung des Antikörpers eluiert und massenspektrometrisch oder durch Edman-Abbau identifiziert werden.

Mit dem neuen Verfahren können Proteine aus dem Abbau von Zellen, aus Körperflüssigkeiten oder Geweben nicht nur quantifiziert sondern beispielsweise auch auf posttranslationale Modifikationen sowie Single Nucleotide Polymorphismen hin untersucht werden.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Analyse von Proteinen, bei dem ein Array von für Peptidepitope spezifischen ersten Fängermolekülen eingesetzt wird,
gekennzeichnet durch die Schritte:

Abbau der zu analysierenden Proteine oder einer die zu analysierenden Proteine enthaltenden Proteinmischung zu den Peptidepitopen entsprechenden Peptidfragmenten,

Inkubation des Arrays mit den Peptidfragmenten, und

Nachweis von an die ersten Fängermoleküle gebundenen Peptidfragmenten.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß nach der Inkubation ungebundene Peptidfragmente gewaschen werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Peptidfragmente vor der Inkubation markiert werden.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß der Nachweis über markierte zweite Fängermoleküle erfolgt, die spezifisch das an das erste Fängermolekül gebundene Peptidfragment erkennen.

5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die zweiten Fängermoleküle ausgehend von Komplexen aus ersten Fängermolekülen und daran gebundenen Peptidpitopen erzeugt werden.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die ersten Fängermoleküle ausgehend von Peptidpitopen erzeugt werden, die gezielt im Hinblick auf Peptidfragmente hergestellt werden, die bei dem Abbau der zu analysierenden Proteine entstehen.
7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die gezielt hergestellten Peptidpitope ausgewählt werden aus potentiellen Peptidpitopen der zu analysierenden Proteine.
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die potentiellen Peptidpitope aus bekannten Aminosäure- und/oder Nukleinsäuresequenzen der zu analysierenden Proteine abgeleitet werden.
9. Verfahren nach Anspruch 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, daß als potentielle Peptidpitope solche Sequenzabschnitte ausgewählt werden, die bei dem Abbau der zu analysierenden Proteine erhalten bleiben.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die gezielt hergestellten Peptidpitope so markiert und/oder modifiziert werden, wie die Peptidfragmente nach/bei dem Abbau der zu analysierenden Proteine.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die gezielt hergestellten Peptidpitope mit posttranslationalen Modifikationen versehen werden..
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß die gezielt hergestellten Peptidpitope gegenüber den potentiellen Peptidpitopen zumindest einen Aminosäureaustausch und/oder eine Deletion einer Aminosäure aufweisen.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß das oder jedes Fängermolekül ein Antikörper, ein Antikörperfragment, ein Peptid-Aptamer oder ein sonstiges, durch chemische Synthese oder Mutation von Bindungsdomänen rekombinant herstellbares Fängermolekül ist.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Bindungsspezifität der Fängermoleküle durch Bindungstests mit in einzelnen Aminosäuren oder ihrer Länge variierten Peptiden ermittelt wird.
15. Fängermolekül, insbesondere zur Verwendung in einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß es spezifisch an Peptidpitope bindet, die Peptidfragmenten entsprechen, in die zu analysierende Proteine abbaubar sind.
16. Fängermolekül nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Peptidpitope in dem Protein selbst für das Fängermolekül nicht zugänglich sind.

17. Fängermolekül, das spezifisch an einen Komplex aus einem Fängermolekül nach Anspruch 15 oder 16 und dem entsprechenden Peptidepitop bindet.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 01/12295

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N33/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>LEVILLIERS NICOLETTE ET AL: "Monoclonal and polyclonal antibodies detect a new type of post-translational modification of axonemal tubulin." JOURNAL OF CELL SCIENCE, vol. 108, no. 9, 1995, pages 3013-3028, XP002193117 ISSN: 0021-9533 abstract</p> <p style="text-align: center;">--- -/-</p>	1-14

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E' earlier document but published on or after the international filing date
- *L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *&' document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 March 2002

Date of mailing of the international search report

05/04/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Luis Alves, D

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 01/12295

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>JEAN F ET AL: "A novel protein immunoassay with predetermined specificity using monoclonal antibodies against tryptic fragments: application to HIV P24 antigen"</p> <p>JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V.,AMSTERDAM, NL, vol. 185, no. 1, 11 September 1995 (1995-09-11), pages 103-114, XP004021158 ISSN: 0022-1759 abstract page 103, right-hand column, paragraph 1 -page 104, left-hand column, paragraph 1 page 107, right-hand column, paragraph 2 -page 112, left-hand column, paragraph 1</p> <p>---</p>	1-14
A	<p>GENG M ET AL: "Signature-peptide approach to detecting proteins in complex mixtures"</p> <p>JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V. AMSTERDAM, NL, vol. 870, no. 1-2, February 2000 (2000-02), pages 295-313, XP004187331 ISSN: 0021-9673 abstract page 299, left-hand column, paragraph 3 -right-hand column, paragraph 2</p> <p>---</p>	1-14
A	<p>GRIMM R ET AL: "Nanogram scale separations of proteins using capillary high-performance liquid chromatography with fully-automated on-line microfraction collection followed by matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry, protein sequencing and Western blot analysis"</p> <p>JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A, ELSEVIER SCIENCE, NL, vol. 800, no. 1, 20 March 1998 (1998-03-20), pages 83-88, XP004112376 ISSN: 0021-9673 abstract</p> <p>---</p>	1-14
A	<p>WO 00 45168 A (HOCHSTRASSER DENIS FRANCOIS ;UNIV GENEVE (CH); SANCHEZ JEAN CHARLE) 3 August 2000 (2000-08-03) abstract</p> <p>---</p>	1-14
A	<p>WO 96 05847 A (UNIV PENNSYLVANIA ;EBERWINE JAMES (US)) 29 February 1996 (1996-02-29) abstract; claims</p> <p>-----</p>	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP 01/12295

Additional matter PCT/ISA/210

Continuation of Field I.2

Claims Nos. 15-17

The subject matter of the application for protection of Claims Nos. 15 to 17 is not clearly defined (PCT Article 6).

Claim No. 15 refers to molecules but does not contain any technical features that define the molecules. In Claim No. 15, it was attempted to define the subject matter of the claim using the peptide epitopes which, however, are also not defined.

This is also valid for Claims Nos. 16 and 17, which are dependent on Claim No. 15 or which refer to this claim.

The applicant is therefore advised that patent claims or sections of patent claims laid to inventions for which no international search report was drafted normally cannot be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). In its capacity as the authority entrusted with the task of carrying out the international preliminary examination, the EPO does not generally carry out a preliminary examination of subject matter for which no search has been conducted. This is also valid in the case when the patent claims have been amended after receipt of the international search report (PCT Article 19) or in the case when the applicant submits new patent claims pursuant to the procedure in accordance with PCT Chapter II.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 01/12295

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0045168	A	03-08-2000	AU 2905600 A	18-08-2000
			WO 0045168 A1	03-08-2000
			EP 1147414 A1	24-10-2001
WO 9605847	A	29-02-1996	CA 2197493 A1	29-02-1996
			EP 0778777 A1	18-06-1997
			JP 10507344 T	21-07-1998
			WO 9605847 A1	29-02-1996

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/12295

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 G01N33/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RESEARCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	LEVILLIERS NICOLETTE ET AL: "Monoclonal and polyclonal antibodies detect a new type of post-translational modification of axonemal tubulin." JOURNAL OF CELL SCIENCE, Bd. 108, Nr. 9, 1995, Seiten 3013-3028, XP002193117 ISSN: 0021-9533 Zusammenfassung ----- -/--	1-14



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

14. März 2002

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

05/04/2002

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Beauftragter

Luis Alves, D

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>JEAN F ET AL: "A novel protein immunoassay with predetermined specificity using monoclonal antibodies against tryptic fragments: application to HIV P24 antigen"</p> <p>JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V.,AMSTERDAM, NL, Bd. 185, Nr. 1, 11. September 1995 (1995-09-11), Seiten 103-114, XP004021158 ISSN: 0022-1759 Zusammenfassung Seite 103, rechte Spalte, Absatz 1 -Seite 104, linke Spalte, Absatz 1 Seite 107, rechte Spalte, Absatz 2 -Seite 112, linke Spalte, Absatz 1</p>	1-14
A	<p>GENG M ET AL: "Signature-peptide approach to detecting proteins in complex mixtures"</p> <p>JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V. AMSTERDAM, NL, Bd. 870, Nr. 1-2, Februar 2000 (2000-02), Seiten 295-313, XP004187331 ISSN: 0021-9673 Zusammenfassung Seite 299, linke Spalte, Absatz 3 -rechte Spalte, Absatz 2</p>	1-14
A	<p>GRIMM R ET AL: "Nanogram scale separations of proteins using capillary high-performance liquid chromatography with fully-automated on-line microfraction collection followed by matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry, protein sequencing and Western blot analysis"</p> <p>JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A, ELSEVIER SCIENCE, NL, Bd. 800, Nr. 1, 20. März 1998 (1998-03-20), Seiten 83-88, XP004112376 ISSN: 0021-9673 Zusammenfassung</p>	1-14
A	<p>WO 00 45168 A (HOCHSTRASSER DENIS FRANCOIS ;UNIV GENEVE (CH); SANCHEZ JEAN CHARLE) 3. August 2000 (2000-08-03) Zusammenfassung</p>	1-14
A	<p>WO 96 05847 A (UNIV PENNSYLVANIA ;EBERWINE JAMES (US)) 29. Februar 1996 (1996-02-29) Zusammenfassung; Ansprüche</p>	1-14

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche Nr.: 15-17

Der Gegenstand des Schutzbegehrens der Ansprüche 15 bis 17 ist nicht klar definiert (Artikel 6 PCT).

Anspruch 15 bezieht sich auf Moleküle, enthält aber keine technischen Merkmale, die die Moleküle definieren. Im Anspruch 15 wird versucht, den Gegenstand des Anspruches durch die Peptid epitope zu definieren, welche aber auch nicht definiert sind.

Dieses gilt ebenfalls für die Ansprüche 16 und 17, die von Anspruch 15 abhängig sind, bzw. darauf verweisen.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/12295

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 0045168	A	03-08-2000	AU	2905600 A	18-08-2000
			WO	0045168 A1	03-08-2000
			EP	1147414 A1	24-10-2001
WO 9605847	A	29-02-1996	CA	2197493 A1	29-02-1996
			EP	0778777 A1	18-06-1997
			JP	10507344 T	21-07-1998
			WO	9605847 A1	29-02-1996